

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.  
13. Jg. 1975, S. 89–96

## Über ein maschinelles enzymatisches Verfahren zur Bestimmung der Harnsäure

Von P. Hunziker

F. Hoffman-La Roche & Co. AG Diagnostica Schweizerhalle/Basel und

H. Keller

Klin. chem. Zentrallabor Kantonsspital St. Gallen

(Eingegangen am 24. September 1974)

Es wird ein Continuous Flow Verfahren zur Bestimmung von Harnsäure im Serum mit Uricase/Peroxidase und *o*-Dianisidin als Chromogen beschrieben. Die Methode kann sowohl auf sog. Einkanalssystemen, wie auch auf dem Mehrkanal-System SMA 12/60 (Technicon) eingesetzt werden.

Das neue Verfahren wurde mit sechs verschiedenen anderen, teils manuellen, teils maschinellen Methoden zur Harnsäurebestimmung verglichen; die Resultate wurden statistisch ausgewertet. Es zeigte sich, daß alle enzymatischen Bestimmungsmethoden gut vergleichbare Resultate lieferten, während „chemische Oxidationsverfahren“ systematische Abweichungen ergaben.

### *A mechanized enzymic method for the determination of uric acid*

A continuous flow method is described for the determination of uric acid in serum using uricase and peroxidase, with *o*-dianisidine as the chromogen. The method can be used with single channel systems and with the multichannel system SMA 12/60 (Technicon).

The new method was compared with six other manual and mechanized methods for the dosage of uric acid, and the results were analyzed statistically. The results from all the enzymic methods showed a good correlation, whereas the „chemical oxidation“ methods showed systematic deviations.

Das Prinzip der enzymatischen Harnsäure-UV-Bestimmung mit Uricase wurde 1941 von *Bulger & Johns* (1) erstmalig beschrieben. 1947 wurde es von *Kalckar* (2) für das klinische Laboratorium adaptiert und seither in verschiedenen Modifikationen (4, 5, 6) eingesetzt.

Für die Visualisierung der Uricase-Methode sind verschiedene Prinzipien bekannt. Das älteste ist das 1939 von *Blauch & Koch* (7) vorgeschlagene indirekte Verfahren, das auf der Kombination mit der Phosphorwolframsäure-Methode beruht. Für diese Bestimmung sind später mehrere Verbesserungen bekannt geworden (8, 9). Ein anderes Prinzip verläuft über den Nachweis des bei der Harnsäure-Oxidation entstehenden Wasserstoffperoxid, wobei *o*-Dianisidin in Gegenwart von Peroxidase in den bekannten rotbraunen Farbstoff überführt wird (10, 11). Diese Methode setzt eine vorherige Enteiweißung voraus. Beim erstmals von *Kageyama* vorgeschlagenen Verfahren (12) wird das Wasserstoffperoxid durch Methanol – unter Beteiligung von Katalase – reduziert, der entstehende Formaldehyd mit Acetylaceton und Ammonium-Ionen zum 3,5-Diacetyl-1,4-dihydrolutidin umgesetzt. Eine Enteiweißung ist nicht erforderlich (13).

Die automatisierte Harnsäure-Bestimmung wird bis heute fast ausschließlich mit Reduktionsmethoden durchgeführt. So wurde beim Du Port „ACA“ bis vor kurzem

die Reduktion von Cu[II]-2,2'-biscinchoninsäure-Chelat (14) herangezogen, infolge der unbefriedigenden Richtigkeit mittlerweile aber durch eine kinetische Uricase-UV-Methode ersetzt (15).

Die Harnsäure-Bestimmung auf dem AutoAnalyzer (16, 17) wird heute noch im Prinzip mit Hilfe der 1912 von *Folin und Denis* (18) beschriebenen Phosphorwolframsäure-Reaktion durchgeführt. Da andere im Blut vorhandene reduzierend wirkende Verbindungen stören (19, 20), sind die so ermittelten Harnsäure-Konzentrationen nicht vergleichbar mit Werten, die (auf manuellem Wege) mit Uricase-Verfahren gewonnen werden.

Das von *Gochman & Schmitz* (21) beschriebene enzymatische Continuous Flow Verfahren zur Harnsäurebestimmung hat offenbar nicht die zu erwartende Verbreitung gefunden und nicht zur industriellen Fertigung einer entsprechenden Testpackung geführt. Ein von uns etwa gleichzeitig entwickeltes, ähnliches Continuous Flow System wurde mit sechs verschiedenen anderen heute üblichen Verfahren verglichen, um zu prüfen, ob es an Spezifität und Richtigkeit anderen Methoden nicht nachsteht. Durch ausgiebige Erfahrungen im Routinebetrieb sollte geklärt werden, ob seine Anwendung empfehlenswert ist.

## Experimentelles

Neu entwickeltes Continuous Flow Uricase/Peroxidase-Verfahren<sup>1)</sup>

1. Puffer/Uricase-Lösung: 10 U Uricase<sup>2)</sup> wurden in einem Liter Tetraborat-Puffer (10 mmol/l, pH 9,5) gelöst. Nach klarer Lösung wurden noch 10 ml Tween 20 als Detergens zugefügt.
2. Puffer/Peroxidase-Lösung: In 250 ml Phosphat-Puffer (240 mmol/l, pH 7,0) wurden 2,5 mg Peroxidase<sup>3)</sup> (55 U/mg) gelöst und anschließend mit 2,5 ml Tween 20 versetzt.
3. Chromogen-Lösung: 209,2 µmol *o*-Dianisidin-hydrochlorid wurden in 50 ml bidest. Wasser gelöst und in dunkler Flasche aufbewahrt.
4. Verdünnungslösung: 2,5 ml Tween 20 wurden in 1000 ml 22,2 mmol/l NaCl-Lösung gelöst.
5. Wäßrige Primär-Standards: Es wurde eine 5,95 mmol/l Harnsäurelösung hergestellt, deren aktueller Gehalt durch Kontrolle der Extinktion bei  $\lambda = 293 \text{ nm}$  – nach vorheriger hundertfacher Verdünnung – festgelegt wurde. Der molare Absorptions-Koeffizient der Harnsäure beträgt  $\epsilon_{293} = 12,6 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ .

Das Fließdiagramm ist in Abbildung 1 dargestellt; der Probenakt beträgt 60/min.

Das Verfahren wurde auf AutoAnalyzer-Modellen der ersten und der zweiten Generation erprobt und schließlich endgültig in einen SMA 12/60 eingebaut. Die Probenahme beträgt 60-1/l bis 60-9/l. Als Dialysator wird ein 12- oder (besser) 24-inch-Modell verwendet, die Inkubationsdauer muß mindestens 4 min bei 37 °C betragen. Der gebildete Farbstoff wird bei einer Wellenlänge zwischen 420 und 460 nm gemessen.

### Vergleichs-Verfahren

**Carbonat-Phosphorwolframsäure-Methode** nach *Folin & Denis* (18) in der Modifikation von *Caraway* (22). Arbeitsvorschrift und alle Reagenzien wurden dem Harleco-Set Uric Acid (Best.-Nr. 64148) entnommen.

**AutoAnalyzer-Phosphorwolframsäure-Methode** (Hydroxylamin-Methode) nach l. c. (16). Die Reagenzien waren entsprechend dieser Vorschrift zubereitet, das Fließ-Schema entsprach der Hersteller-Vorschrift.

**Uricase-Endpunktmessung** nach *Praetorius & Poulsen* (3). Als Photometer diente ein PMQ-2 (Zeiss Oberkochen), gemessen wurde bei 293 nm. Alle Reagenzien wurden der Boehringer-Testkombination Harnsäure (Bestell-Nr. 15986) entnommen.

**Direkte kinetische Uricase-Methode**, Du Pont-ACA-Verfahren (15). Die Arbeitsvorschrift und alle erforderlichen Reagenzien wurden entsprechend der Hersteller-Vorschrift eingesetzt.

**Kombinierte Phosphorwolframsäure/Uricase-Methode** „*Caraway-Marable-Verfahren*“ (8), in der Modifikation von *Eisenwiener & Ferrat* (9). Arbeitsvorschrift und alle Reagenzien wurden der Testpackung Harnsäure von Roche Diagnostica, Art.-Nr. 1063, entnommen.

**Uricase/Katalase Verfahren** nach *Kageyama* (12), die Arbeitsvorschrift und alle erforderlichen Reagenzien wurden der Boehringer Packung „Uricquant“ (Bestell-Nr. 15865) entnommen.

### Testmaterialien und Analysengut

Wäßrige Primär-Standards: s. o.

Kommerzielle Kontroll-Seren: siehe Tabelle 2.

Patienten-Plasmen des Kantonsspitals St. Gallen: Blutentnahmen mittels Monovetten (23), die mit Ammoniumheparinat imprägniert waren. Alle Blutproben wurden innerhalb 1 h

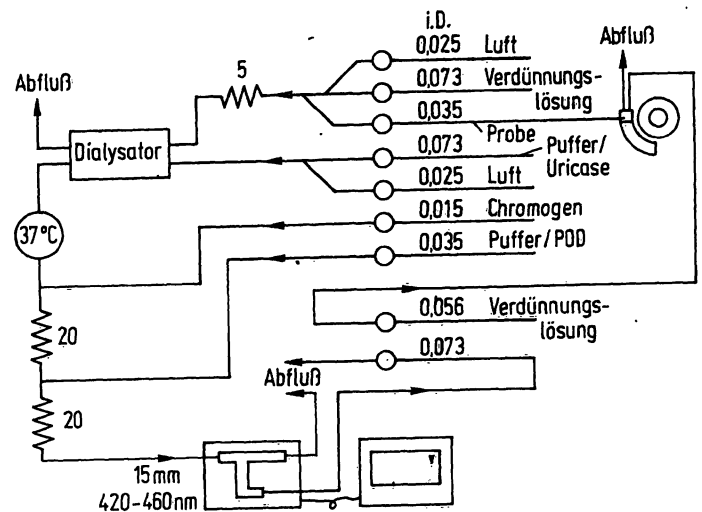


Abb. 1. Fließdiagramm zum Uricase/Peroxidase-Verfahren. Einzelheiten siehe Text.

nach der Blutentnahme zentrifugiert und das Plasma abgetrennt. Wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, wurde dieses Untersuchungsgut eingesetzt.

**Urämie-Plasmen** (Kantonsspital St. Gallen): Entnahmen wie vorstehend. Als urämisch gelten Plasmen mit Harnstoff-Konzentrationen über 12,5 mmol/l (75 mg Harnstoff/100 ml) und Creatinin-Gehalten über 0,133 mmol/l (1,5 mg Creatinin/100 ml).

**Lipämie-Plasmen** (Kantonsspital St. Gallen): Blutentnahmen wie vorstehend. Als lipämisch gelten solche Plasmen, die visuell milchig trüb waren und deren Triglyceridkonzentration eindeutig weit oberhalb des sog. Normalbereiches lagen (Tab. 8).

**Probanden-Plasmen** der „Studie Uzwil“ (25): Blutentnahmen wie bei den Spitalpatienten, die Blutproben wurden innerhalb von 2 h nach der Blutentnahme zentrifugiert und das Plasma abgetrennt.

„Studie Bad Ragaz“: Blutentnahme bei Patienten eines Ambulatoriums wie oben.

„Spital Liestal“ und „Basler Studie“: Konventionelle Blutentnahme mittels Record-Spritzen, Überführen des Blutes in Glas-Zentrifugen-Röhrchen, nach abgelaufener Gerinnung Zentrifugieren mit anschließender Separierung des Serums.

## Ergebnisse

### Linearitätsbereich

Der Linearitätsbereich des neuentwickelten Verfahrens wurde mit wäßrigen Verdünnungsreihen von Harnsäure-Lösungen geprüft. Es zeigte sich, daß bis 2400 µmol/l lineare Absorptionsdifferenzen ermittelt werden konnten. Die Tabelle 1 gibt das Ergebnis dieser Meß-Serie wieder.

Tab. 1. Linearität der Methode: Wäßrige Harnsäure-Standards der Konzentrationen 297, 595, 892, 1190, 1785 und 2380 µmol/l wurden wie Proben eingesetzt und die Ergebnisse auf den Standard 892 µmol/l (S) bezogen. Die Meßreihe wurde mit einem 24 inch-Dialysator und einer Inkubationsdauer von 4 min durchgeführt.

Standard (µmol/l)	297	595	892	1190	1785	2380
Ergebnis (µmol/l)	282	571	S	1200	1810	2420

<sup>1)</sup> Testpackung Harnsäure (Uricase/POD) Continuous Flow von Roche Diagnostica, Art. Nr. 1502.

<sup>2)</sup> Uricase, Urate:oxygen oxidoreductase, EC 1.7.3.3.

<sup>3)</sup> Peroxidase, Donor:hydrogen-peroxide oxidoreductase, EC 1.11.1.7.

Tab. 2. Vergleich der mit der Uricase/Peroxidase-Methode gefundenen Resultate mit den Deklarationswerten verschiedener Kontrollseren (Richtigkeit).

Serum	Deklaration [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Methode	Ergebnis [ $\mu\text{mol/l}$ ]
Hyland I 0369 R007 A1	303 (286–321)	Phosphorwolframsäure, Beckman Uricase AutoAnalyzer Hycel Mark X	274
	303		
	274		
Hyland II 0368 T004 B1	595 (565–625)	Phosphorwolframsäure, Beckman Uricase AutoAnalyzer Hycel Mark X Harleco	571
	595		
	572		
	595 (559–636)		
Seronorm 118	345	AutoAnalyzer Lab. A Uricase Lab. B Uricase Lab. C Uricase Lab. D Uricase Lab. E	333
	399		
	321		
	315		
	321		
Monitrol I 114 B	286	Folin Kern-Stransky, Lab. A Kern-Stransky, Lab. B Caraway AutoAnalyzer	291
	321		
	297		
	315		
	315		
Monitrol II 27 A	482	Folin Kern-Stransky, Lab. A Kern-Stransky, Lab. B Caraway AutoAnalyzer	488
	518		
	494		
	506		
	500		

Bei Lagerung der Uricase-Lösung bei Raumtemperatur nimmt der Linearitätsbereich ab, nach 28 Tagen ist er auf etwa 1200  $\mu\text{mol/l}$  abgesunken. Wird die Puffer-Uricase-Lösung dagegen bei + 4 °C im Kühlschrank gelagert, so ist auch nach 4 Wochen noch keine Veränderung des Linearitätsbereiches meßbar.

### Richtigkeit

Die Richtigkeit wurde mit Hilfe von käuflichen Kontrollseren überprüft. Dabei wurde das Ergebnis an Hand eines wäßrigen Primärstandards, dessen Konzentration 297  $\mu\text{mol/l}$  betrug, berechnet. Das Ergebnis zeigt die Tabelle 2, die mit der neuen Methode ermittelten Resultate stimmen mit den deklarierten Resultaten gut überein.

### Präzision

Die Präzision „in der Serie“ wurde an 5 verschiedenen kommerziellen Kontrollseren geprüft. Standardabweichung und Variations-Koeffizient gehen aus der Tabelle 3 hervor.

Die Präzision „von Tag zu Tag“, beobachtet über die ersten 7 Monate des Jahres 1974, wobei an sechs Tagen der Woche Präzisionskontrollen durchgeführt wurden, zeigt die Tabelle 4.

Tab. 3. Präzision „in der Serie“. Reproduzierbarkeit der Methode bei verschiedenen Kontrollseren.

$\bar{x}$  = Mittelwert Harnsäure [ $\mu\text{mol/l}$ ]

s = Standardabweichung [ $\mu\text{mol/l}$ ]

VK = Variationskoeffizient (%)

N = Anzahl der in der Serie durchgeführten Bestimmungen.

Serum	$\bar{x}$	s	VK	N
Hyland I 0369 R 007A1	268	3,2	1,20	15
Roche C 1237	248	2,9	1,18	15
Hyland II 0368 T002A1	542	0,7	0,13	10
Monitrol I 119 AB	261	1,9	0,73	10
Seronorm 120	290	4,2	1,43	10

### Wiederfindung („Recovery“)

Zwei kommerziellen Kontrollseren wurden gleiche Mengen wäßriger Standardlösung bekannter Konzentration zugefügt und die Wiederfindung berechnet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 zusammengestellt.

Tab. 4. Präzision von „Tag zu Tag“, Ergebnisse der Routine-Qualitätskontrolle in den ersten sieben Monaten des Jahres 1974.

$\bar{x}$  = Mittelwert Harnsäure [ $\mu\text{mol/l}$ ]  
 $s$  = Standardabweichung [ $\mu\text{mol/l}$ ]  
 VK = Variationskoeffizient (%).

Monat	$\bar{x}$	$s$	VK
Januar	260,2	8,3	3,18
Februar	263,7	9,9	3,77
März	293,9	5,4	1,84
April	296,5	4,8	1,63
Mai	292,3	8,0	2,75
Juni	290,1	7,3	2,52
Juli	287,1	10,9	3,79

Tab. 5. Recovery-Untersuchungen.

$S_1$ : Hyland I 0369 R007 A1  
 $S_2$ : Hyland II 0368 R001 A1  
 $H_1$ : Harnsäure-Standard 55,3  $\mu\text{mol/l}$   
 $H_2$ : Harnsäure-Standard 110,6  $\mu\text{mol/l}$   
 $H_3$ : Harnsäure-Standard 166  $\mu\text{mol/l}$   
 Die lyophilisierten Kontrollseren wurden in Wasser, bzw. in den Harnsäurelösungen  $H_1$ ,  $H_2$  und  $H_3$  aufgelöst.

Lösung	gefunden	Sollwert	Recovery
$S_1$	268		
$S_1 + H_1$	321	323	99,4
$S_1 + H_2$	377,5	378	99,9
$S_1 + H_3$	434	433	100,2
$S_2$	533		
$S_2 + H_1$	600	588	102
$S_2 + H_2$	654	644	101,5
$S_2 + H_3$	695	699	99,4

### Verschleppung („Carry Over“)

Für Continuous Flow Systeme läßt sich bekanntlich ein gewisser Verschleppungsfehler grundsätzlich nicht restlos

vermeiden. Die quantitative Untersuchung dieses Fehlers nach der Methode von *Hjelm* (24) zeigt die Tabelle 6. Der erhaltene Interaktionskoeffizient  $q = 0,012$  beweist den geringen Störeinfluß durch Probenwechselwirkung.

### Interferenzen

Auf eventuelle Störeinflüsse durch Verbindungen, die im strömenden Blut enthalten sind, wurde geprüft durch Auflösen von lyophilisierten Kontrollseren in wäßrigen Lösungen dieser Komponenten. Untersucht wurden derartige Lösungen folgender Verbindungen:

Allantoin	630 $\mu\text{mol/l}$
<i>p</i> -Aminobenzoesäureäthylester	600 $\mu\text{mol/l}$
Ascorbinsäure	284 $\mu\text{mol/l}$
Gentisinsäure	47 $\mu\text{mol/l}$
Glutathion	325 $\mu\text{mol/l}$
Creatinin	440 $\mu\text{mol/l}$
1-Phenyl-2,2-dimethyl-4-aminopyrazolon-(5)	98 $\mu\text{mol/l}$

Die in der Tabelle 7 wiedergegebenen Ergebnisse zeigen, daß die Harnsäurebestimmung durch physiologische

Tab. 6. Quantitative Bestimmung des Interaktionskoeffizienten  $q$  nach *Hjelm* (24)

$$q = \frac{S_4 - S_2}{S_3 - S_4} = 0,012$$

$S_1, S_2, S_4$  = Standard 178  $\mu\text{mol/l}$   
 $S_3$  = Standard 952  $\mu\text{mol/l}$ .

Probe	$S_1$	$S_2$	$S_3$	$S_4$
Harnsäure, gefunden [ $\mu\text{mol/l}$ ]	174	178	928	187

Tab. 7. Untersuchung auf mögliche Störeinflüsse.

Serum	Zugefügte Fremdschubstanz	Sollwert ( $\mu\text{mol/l}$ )	Gefunden ( $\mu\text{mol/l}$ )
Monitrol I 119 AB	—	274	274
	Allantoin	630 $\mu\text{mol/l}$	274
	Glutathion	325 $\mu\text{mol/l}$	274
	Creatinin	440 $\mu\text{mol/l}$	274
Seronorm 120	—	303	303
	Ascorbinsäure	284 $\mu\text{mol/l}$	303
Monitrol II 33 AB	—	577	
		559	
		654	523
		631	
		601	
	Gentisinsäure	47 $\mu\text{mol/l}$	493
	<i>p</i> -Aminobenzoesäureäthylester	600 $\mu\text{mol/l}$	522
	1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-aminopyrazolon-(5)	98 $\mu\text{mol/l}$	495

Tab. 8. Harnsäure-Bestimmung in stark lipämischen, milchig trüben Plasmen mit drei verschiedenen Methoden. Einzelheiten siehe Text.

Nr.	Cholesterin [mmol/l]	Triglyceride [mmol/l]	Harnsäure [ $\mu\text{mol/l}$ ]		
			Roche	ACA	Kageyama
1	5,66	17,1	500	488	52
2	6,98	13,8	286	303	17
3	6,08	18,9	559	506	negativ
4	6,72	8,8	321	291	17
5	12,5	41,2	226	256	11
6	21,8	30,4	512	434	36
7	6,75	21,7	345	291	5,9
8	13,8	44,4	589	529	23
9	14,8	17,7	506	440	negativ
10	9,83	20,6	535	506	36

Konzentrationen<sup>4)</sup> dieser Fremdstoffe nicht wesentlich beeinflusst wird.

#### Vergleichbarkeit mit anderen Verfahren zur Harnsäure-Bestimmung

Das beschriebene Uricase/Peroxidase-Verfahren wurde mit der „klassischen“ Phosphorwolframsäure-Methode (Abb. 2), mit der manuellen (Abb. 3) und einer automatisierten (kinetischen) direkten Uricase UV-Methode und schließlich mit zwei anderen „indirekten“ Uricase-Methoden verglichen. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

<sup>4)</sup> Roseman & Dorfman (30) geben als maximale Serum-Gentisinsäure Konzentration – nach oraler Verabreichung von 1,8 g Natriumsalicylat (entsprechend 6 Aspirintabletten) – 18,7  $\mu\text{mol/l}$  an.  
Nach Brubacher (Basel, persönl. Mitt.) gilt für Probanden mit regelmäßiger Vitamin C-Einnahme folgender Serumascorbinsäure-Normalbereich:  $\bar{x} = 72,1 \mu\text{mol/l}$ ,  $s = 34,1 \mu\text{mol/l}$ .

Tab. 9. Übersicht Methodenvergleich.

Methoden-Vergleich	N	$y = f(x)$	r	$S_y$ ( $\mu\text{mol/l}$ )	$S_x$ ( $\mu\text{mol/l}$ )
1. Uricase-Peroxidase/manuelle Phosphorwolframsäure-Methode	199 (Basler Studie)	$y = 1,006x - 34,1 \mu\text{mol/l}$	0,903	77,1	76,7
2. Uricase-Peroxidase/manuelle Uricase-UV-Methode	101 (Spital Liestal)	$y = 1,041x - 14,1 \mu\text{mol/l}$	0,976	148,1	142,4
3. Uricase-Peroxidase/direkte, kinetische Uricase-UV-Methode	20	$y = 1,002x - 0,9 \mu\text{mol/l}$	0,998	91,2	91,0
4. Uricase-Peroxidase/Phosphorwolframsäure-Uricase-Methode	237 (Spital Liestal)	$y = 0,926x + 12,2 \mu\text{mol/l}$	0,948	135,9	146,1
5. Uricase-Peroxidase/Uricase-Katalase-Methode (Kageyama)	50 (Bad Ragaz-Studie)	$y = 1,026x - 8,0 \mu\text{mol/l}$	0,987	94,7	92,3

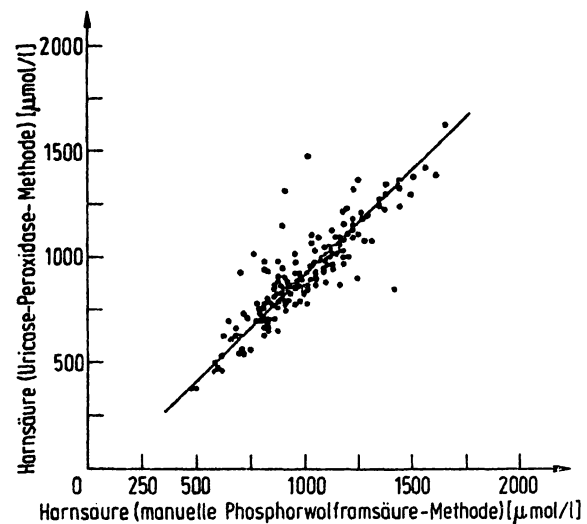


Abb. 2. Vergleich von Harnsäurebestimmungs-Methoden: Uricase/Peroxidase-Methode gegen manuelle Phosphorwolframsäure-Methode. Einzelheiten siehe Text.

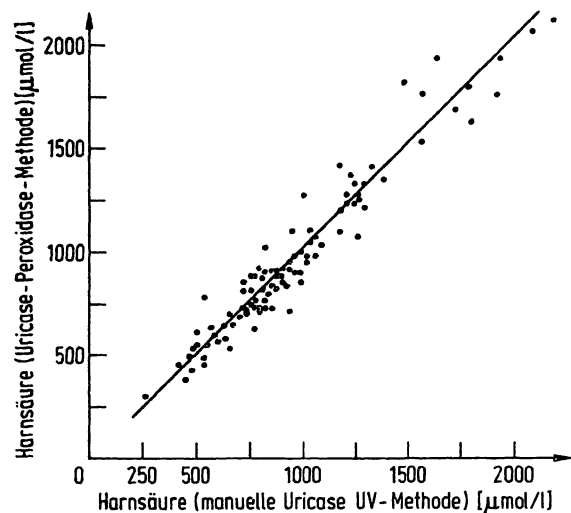


Abb. 3. Vergleich von Harnsäurebestimmungs-Methoden: Uricase/Peroxidase-Methode gegen manuelle Uricase UV-Methode. Einzelheiten siehe Text.

## Ergebnisse und Vergleichbarkeit bei Blutproben von urämischen und hyperlipidämischen Patienten

### Urämie-Plasmen

Uricase/Peroxidase/o-Dianisidin-Verfahren, verglichen mit der AutoAnalyzer-Phosphorwolframsäure-Methode.

Für diese Vergleichsuntersuchungen standen die Plasmen von 105 verschiedenen Patienten zur Verfügung.

Die Resultate sind in der Abbildung 4 wiedergegeben. Man ersieht daraus, daß eine systematische Abweichung zwischen den Methoden besteht, wobei erwartungsgemäß die Resultate des Uricase/Peroxidase/o-Dianisidin-Verfahrens 120  $\mu\text{mol/l}$  niedriger liegen. Die Ausgleichsgerade wurde in der Abbildung nicht eingetragen, da sie offensichtlich nicht befriedigt. Man hat den Eindruck, daß die höheren Harnsäure-Werte einer zweiten Ausgleichsgeraden zuzuordnen wären, bzw., daß etwa bei  $x = 450$  respektive  $y = 300$  ein Knick liegt. Tatsächlich werden auch sehr differente Ergebnisse erhalten, wenn man die höheren Harnsäure-Werte von den niedrigeren abtrennt und die Vergleichbarkeit der Methoden für diese beiden Kollektive getrennt untersucht. Man kann hier die Hypothese formulieren, daß die Beeinflussung der Phosphorwolframsäure-Methode durch unspezifische Chromogene je nach Schwere der Azotämie unterschiedlich sei. Diese Frage muß aber einer eigenen Untersuchung vorbehalten bleiben.

### Hyperlipidämie-Plasmen

Uricase/Peroxidase/o-Dianisidin-Verfahren, verglichen mit dem Kageyama-Verfahren und dem ACA-Verfahren.

Von auswärtigen Laboratorien war uns berichtet worden, daß die Harnsäure-Bestimmung mit dem Kageyama-Verfahren auf Schwierigkeiten stößt, wenn es sich um lip-

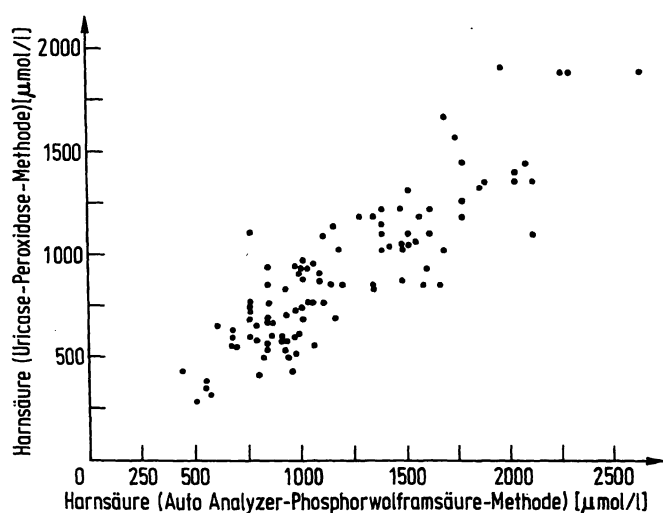


Abb. 4. Vergleich von Harnsäurebestimmungs-Methoden an urämischen Plasmen: Uricase/Peroxidase-Methode gegen Autoanalyzer-Phosphorwolframsäure-Methode. Einzelheiten siehe Text.

ämische Plasmen handelt. Wir haben deshalb milchig trübe, lipämische Plasmen auf ihren Harnsäure-Gehalt untersucht und dabei das Kageyama-Verfahren, das ACA-Verfahren und das Uricase/Peroxidase/o-Dianisidin-Verfahren miteinander verglichen. Es standen uns insgesamt 10 Proben mit extremen Triglycerid- und teilweise erhöhten Cholesterin-Konzentrationen zur Verfügung. Die Resultate sind in der Tabelle 8 wiedergegeben. Man ersieht daraus, daß bei lipämischen Seren die Korrelation zwischen Uricase/Peroxidase/o-Dianisidin- und ACA-Verfahren deutlich schlechter ist, als bei den klaren Seren, doch können die Werte als vergleichbar bezeichnet werden. Im Gegensatz dazu liefert die Kageyama-Methode unsinnig niedrige, in zwei Fällen sogar „negative“ Resultate.

Ermittlung des sog. Normalbereiches für Plasma-Harnsäure bei Männern in einem Feldversuch „Studie Uzwil“

Von der Abteilung für Präventiv-Medizin des Kantons St. Gallen ist 1973 eine Reihenuntersuchung in einem Schweizerischen Großbetrieb an insgesamt 1413 männlichen Arbeitern und Angestellten durchgeführt worden. Neben zahlreichen anderen klinischen und klinisch-chemischen Parametern wurde dabei mit dem Uricase/Peroxidase/o-Dianisidin-Verfahren der Harnsäurespiegel im Nüchternplasma bestimmt. Das Histogramm und die Percentile sind in der Abbildung 5 wiedergegeben. Das arithmetische Mittel und die 2 s-Grenzen betragen  $279 \pm 145 \mu\text{mol/l}$  ( $134-424 \mu\text{mol/l}$ ).

## Diskussion

Das beschriebene Verfahren liefert vergleichbare Ergebnisse mit allen vier geprüften enzymatischen Methoden. Ob dabei die Extinktionsabnahme bei 293 nm direkt beobachtet wird oder ob die Oxidation durch Sekundärreaktionen visualisiert wird, ist für das Ergebnis offenbar ohne Bedeutung.

Im Gegensatz dazu bestehen systematische Unterschiede zu den Resultaten von nichtenzymatischen Phosphorwolframsäure-Verfahren (Tab. 9). Diese Unterschiede werden noch gravierender, wenn es sich um Seren urämischer Patienten handelt, da bei diesen derart falsch hohe Resultate gefunden werden, daß falsche klinische Interpretationen und Maßnahmen die Folge sein können.

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, daß bei Verwendung käuflicher Kontrollseren die mangelhafte Spezifität der Oxidationsverfahren nicht unbedingt erkennbar ist, da das wechselnde Verhältnis Harnsäure/unspezifische Chromogene der Patientenplasmen nicht ausreichend imitiert werden kann. Hierauf sind vermutlich die divergenten Äußerungen zurückzuführen, die auf dem IV. Internationalen Symposium über Qualitätskontrolle zur

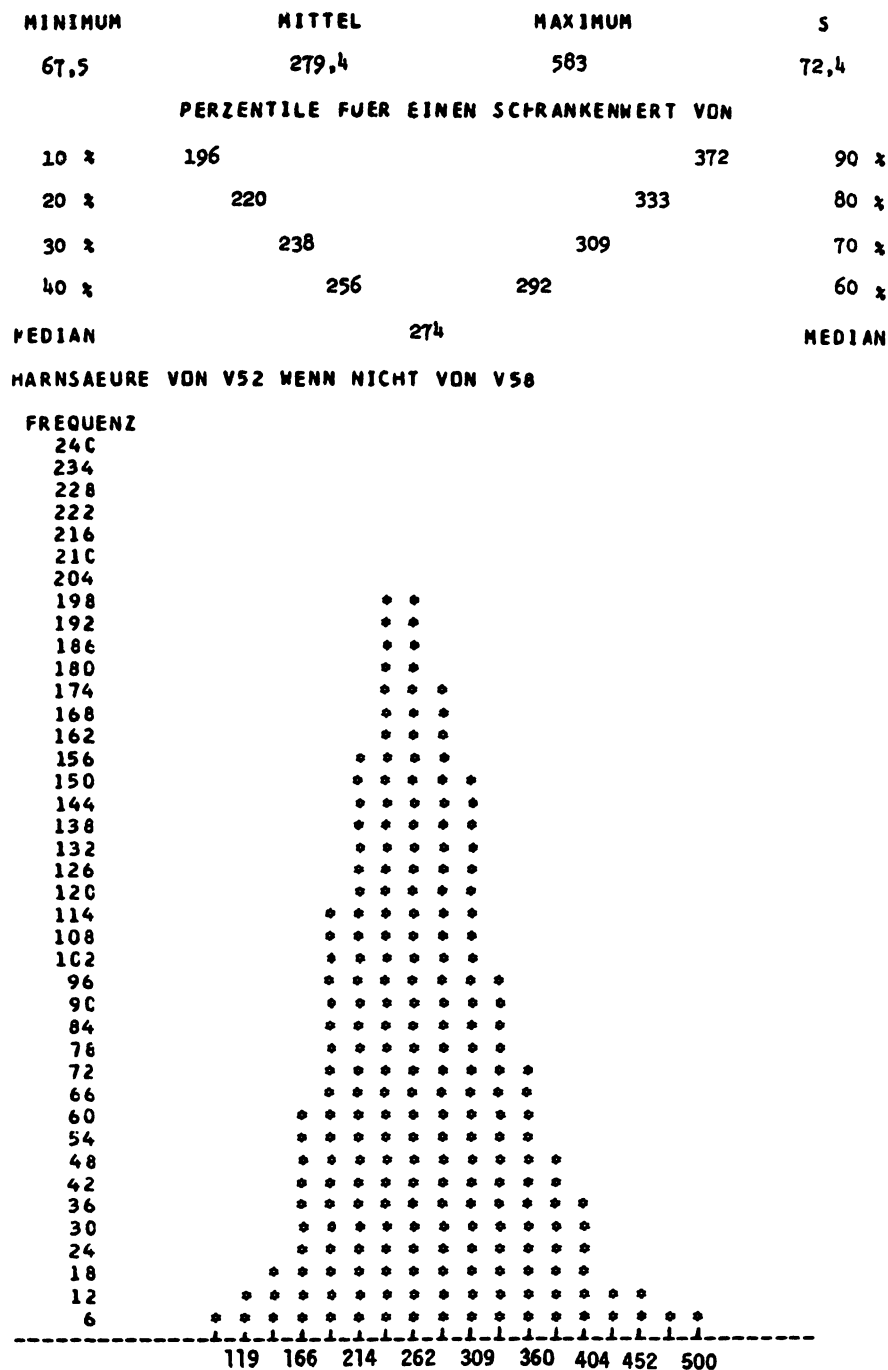


Abb. 5. Histogramm und Perzentile von Harnsäurebestimmungen mittels Uricase/Peroxidase-Methode an 1413 männlichen Probanden.  
Einzelheiten siehe Text.

Harnsäurebestimmung gemacht worden sind (26). Es muß eindeutig festgestellt werden:

1. Wäßrige Harnsäurelösungen in Form von sog. Primärstandards, ergeben mit „chemischen“ Oxidationsmethoden wie mit Uricase-Methoden übereinstimmende Ergebnisse.
2. Humanplasmen/Seren enthalten stets unspezifische Chromogene, die mit den „chemischen“ Oxidationsverfahren eine Verfälschung des Wertes nach oben bewirken.

3. Der Anteil der unspezifischen Chromogene ist beim „Gesunden“ offenbar relativ konstant und im Vergleich zur Harnsäure niedrig. Bei bestimmten Erkrankungen, insbesondere bei Nieren-Insuffizienzen, steigt jedoch der Anteil der unspezifischen Chromogene in einer nicht geringen Zahl von Fällen so stark an, daß grobe Fehlbestimmungen mit den unspezifischen Methoden resultieren.
4. Bei den direkten Uricase-Verfahren werden an die instrumentellen Bedingungen relativ hohe Anforderungen gestellt, wenn eine befriedigende Präzision erreicht werden soll. Sind die meßtechnischen Voraus-

setzungen aber erfüllt, so arbeiten diese Verfahren störungsfrei und führen zu richtigen und präzisen Werten.

5. Die Visualisierung der Uricase-Reaktion mittels einer Katalase/- oder Peroxidase/Chromogen-Reaktion, kann durch verschiedene Faktoren gestört werden, z. B. ist die *Kageyama*-Methode gegen stärkere lipämische Trübungen empfindlich. Daß Peroxidase/Chromogen-Reaktionen durch andere Redox-Substanzen, insbesondere durch Ascorbinsäure gestört werden können, ist seit langem bekannt. Durch geeignete Bedingungen ist es aber möglich, diese Störungen auszuschalten oder so gering zu halten, daß sie für das Resultat irrelevant sind.
6. Die Wichtigkeit einer nicht nur präzisen, sondern auch richtigen Harnsäurebestimmung ist durch den Zusammenhang zwischen Harnsäure und Gicht gegeben.

Die Störung der *Kageyama*-Methode durch lipämische Trübungen wird weder in der Originalarbeit (12) noch in der deutschen Einführungsarbeit von *Forstmayr* (13) oder der vergleichenden Untersuchung von *Mertz* (27) erwähnt. Andererseits ist die Adaptation dieses Verfahrens auf das Continuous Flow System so lange nicht möglich, bis die Gesamtinkubationsdauer nicht auf 9 min – die in einem Mehrkanalsystem maximal zur Verfügung stehende Zeit – beschränkt werden kann.

Das beschriebene Verfahren hat sich in der Praxis ohne Einschränkung bewährt: Seit Januar 1973 sind damit über 50 000 Harnsäurebestimmungen durchgeführt worden, ohne daß eine Beanstandung erfolgt ist.

## Literatur

1. Bulger, H. A. & Johns, H. E. (1941), *J. Biol. Chem.* **140**, 427–440.
2. Kalckar, H. M. (1947), *J. Biol. Chem.* **167**, 429–443.
3. Praetorius, E. & Poulsen, H. (1953), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **5**, 273–280.
4. Zöllner, N. (1963), *diese Z.* **1**, 178–182.
5. Kortüm, M. & Klin, O. (1972), *Ärztl. Lab.* **18**, 33–36.
6. Da Fonseca-Wollheim, F. (1972), *diese Z.* **10**, 136.
7. Blaich, M. B. & Koch, F. C. (1939), *J. Biol. Chem.* **130**, 443–454.
8. Caraway, W. T. & Marable, H. (1966), *Clin. Chem.* **12**, 18–24.
9. Eisenwiener, H. G. & Ferrat, R. (1974), *Chem. Rundsch.* **27**, No. 7, 19–21.
10. Lorentz, K. & Berndt, W. (1967), *Anal. Biochem.* **18**, 58–63.
11. Domagk, G. F. & Schlicke, H. H. (1968), *Anal. Biochem.* **22**, 219–224.
12. Kageyama, N. (1971), *Clin. Chim. Acta* **31**, 421–426.
13. Forstmayr, H. (1974), *Ärztl. Lab.* **20**, 125–132.
14. Gindler, E. M. (1970), *Clin. Chem.* **16**, 536.
15. Lum, G. & Gambino, S. R. (1973), *Clin. Chem.* **19**, 1184 bis 1186.
16. Musser, A. W. & Ortigoza, C. (1966), *Tech. Bull. Regist. Med. Technol.* **36**, 21–25.
17. Nishi, H. (1967), *Clin. Chem.* **13**, 12–18.
18. Folin, O. & Denis, W. (1912–13), *J. Biol. Chem.* **13**, 469 bis 475.
19. Johnstone, J. M. (1952), *J. Clin. Pathol.* **5**, 317–318.
20. Henry, R. J., Sobel, C. & Kim, J. (1957), *Amer. J. Clin. Pathol.* **28**, 152–160.
21. Gochman, N. & Schmitz, J. M. (1971), *Clin. Chem.* **17**, 1154–1159.
22. Caraway, W. T. (1963), *Stand. Meth. Clin. Chem.* **4**, 239 bis 247.
23. Keller, H. (1971), *Diagnostik* **4**, 393–396.
24. Hjelm, M. (1968), *Z. Anal. Chem.* **243**, 781–790.
25. Escher, M., Heyden, S., Christeller, S., Gasser, J. P., Keller, H., Ramsler, L. & Geel, O., *Schweiz. Med. Wochenschr.*, im Druck.
26. Rappoport, A. E. (Ed.) (1972), *Quality Control in Clinical Chemistry*, Huber, Bern.
27. Mertz, D. P. (1973), *Klin. Wochenschr.* **51**, 96–98.
28. Thefeld, W., Hoffmeister, H., Busch, E. W., Koller, P. U. & Vollmar, J. (1973), *Deut. Med. Wochenschr.* **98**, 380–384.
29. Griebisch, A. & Zöllner, N. (1973), *diese Z.* **11**, 348–356.
30. Roseman, S. & Dorfman, A. (1951), *J. Biol. Chem.* **192**, 105–114.

Prof. Dr. H. Keller  
Kantonsspital  
CH-9000 St. Gallen

In der Uzwiler-Studie (25) wurden Harnsäure-Bestimmungen an Proben von über 1400 Männern durchgeführt. Dabei wurde ein Mittelwert von 279  $\mu\text{mol/l}$  mit einem 2s-Bereich von 134 bis 424  $\mu\text{mol/l}$  gefunden. Wenn man die Percentile mit Schrankenwerten von 10–90% ermittelt, so ergeben sich für diese Kollektiv 196–372  $\mu\text{mol/l}$ , mit einem Median von 274  $\mu\text{mol/l}$ .

In jüngster Zeit sind zwei größere Studien in ähnlicher Art in Berlin von *Hoffmeister* (28) und in München von *Zöllner* (29) durchgeführt worden. In beiden Untersuchungen wurden enzymatische Verfahren zur Harnsäure-Bestimmung eingesetzt. *Zöllner* hat mit seiner Methode (4) für Männer den Bereich von 229–482  $\mu\text{mol/l}$  ermittelt, während in Berlin mit dem *Kageyama*-Verfahren (12) für Männer 202–416  $\mu\text{mol/l}$  errechnet wurden. Die eigenen Ergebnisse liegen demnach zwischen denen von Berlin und München.

Man darf daher mit Recht annehmen, daß Harnsäure-Bestimmungen mit Uricase-Verfahren, gleichgültig in welcher Modifikation, zu weitgehend identischen, präzisen und richtigen Resultate führen. Da dies bei den „chemischen“ Oxidationsmethoden zur Harnsäurebestimmung nicht der Fall ist, sollten sie aus den klinischen Laboratorien eliminiert werden. Auch im Hinblick darauf, daß Uricase-Verfahren heute von vielen, auch von kleineren Laboratorien durchgeführt werden, scheint es nicht mehr erlaubt, die Phosphorwolframsäure-Methode im AutoAnalyzer des Kliniklabors zu verwenden.

Es gibt keinen Grund, dieses unspezifische Verfahren beizubehalten. Die – vergleichsweise geringen – höheren Unkosten, die bei Uricase-Verfahren anfallen, sind durch die höhere diagnostische Sicherheit gerechtfertigt.